云 南 植 物 研 究 2002，**24**（4）：521～524
Acta Botanica Yunnanica

黄秋葵组培快繁的研究*

刘国民，李娟玲，王英义，黎金华
（海南大学农学院，海南 海口 570228）

A Study on the Rapid Propagation of *Hibiscus esculentus* via Tissue Culture

LIU Guo-Min，LI Juan-Ling，WANG Ying-Yi，LI Jing-Hua
（*The Agriculture College of Hainan University*，Haikou 570228，China）

Abstract：The sterile seedlings of *Hibiscus esculentus* L. were obtained via sterile germination. The stem segments with one leaf and one axillary bud could be repeatedly subcultured on the medium "MS + 1.0 mg/L IBA", and a propagation coefficient is 3 – 4 in each subculture. KT had a strong inhibiting effect on the germination and growth of the axillary buds of *Hibiscus esculentus* L.，and a strong dedifferentiating effect on the stem segments. About 25% of the calli，cultured on the medium "MS + 0.5 – 1.0 mg/L IBA" for 50 – 60 days，transformed into somatic embryoids，which were visible to the naked eye. Most of the somatic embryoids will develope into the intact plantlets on the same medium 30 days later.

Key words：*Hibiscus esculentus* L.；Stem-segment culture；Somatic embryoid；Plantlet regeneration
关键词：黄秋葵；茎段培养；体细胞胚；植株再生
中图分类号：Q 945　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253－2700（2002）04－0521－04

黄秋葵（*Hibiscus esculentus* L.）为锦葵科一年生草本植物，别名羊角豆、秋葵。原产非洲，欧美及东南亚热带地区广泛栽培（马传先，1999；李正应，1993；翁文，1997；雪珍等，1999）。黄秋葵是一种营养保健型蔬菜，其花、叶、芽、果均可食用，种子富含油脂、蛋白质及钾、钙、铁、锌、锰等矿物质，晒干后既可用于提取油脂和蛋白质，还可作为咖啡的添加剂或代用品。花、种子和根均可入药，对恶疮、痛疖有疗效。黄秋葵的愈伤组织在一定条件下比较容易产生体细胞胚并再生成完整植株，故黄秋葵的组培快繁研究也可为胚胎学研究和人工种子制作奠定基础，甚至可以把黄秋葵作为体细胞胚胎发生和人工种子研制的模式植物。因此，黄秋葵的组培快繁研究不仅在生产上具有重要的应用价值，而且同时具有重要的理论意义。

1 材料与方法

1.1 材料

用黄秋葵成熟种子经表面消毒后进行无菌发芽，然后取无菌实生苗作为实验材料。

1.2 方法

* 收稿日期：2001－10－22，2001－11－16 接受发表
作者简介：刘国民（1955－）男，博士、教授，主要从事植物组织培养及植物种质资源的研究。

1.2.1 材料的表面消毒

将成熟而尚未裂开的黄秋葵果荚撕开，取其中的种子置于锥形瓶中，注入满瓶 75%乙醇灭菌 5 min；弃去乙醇消毒液，然后加入满瓶 0.2%升汞消毒 10 min；弃去升汞消毒液，再用无菌水冲洗 3~4 次，沥干水备用。

1.2.2 取材与接种

在超净工作台上，将经过表面消毒的黄秋葵种子接种于无菌发芽培养基表面上。待种子萌发后，在苗高 5~6 cm 时，将无菌苗剪切成带一叶一芽的茎段转接到不同的增殖培养基上，或切取其节间的茎段转接到诱导培养基上诱导愈伤组织形成；待愈伤组织直径达 0.5~0.6 cm 时，切取愈伤组织转接到体胚诱导培养基上，经 50~60 d 培养，待体细胞胚胎形成并发育成完整的丛生小苗时，将小苗分割单株，转接到壮苗培养基上。

1.2.3 培养基的配制及培养条件

本试验所采用的培养基均按植物组织培养的常规方法配制与灭菌（曹孜义和刘国民，1999）。培养室内的温度控制在（24±2）℃范围内；用日光灯照明，光照强度约为 2000 lx；每天照明 10 h（8：00~18：00）。

1.2.4 培养基配方

无菌发芽培养基的成分为：1/2MS 大量元素 + MS 微量元素 + 肌醇 100 mg/L（单位下同） + 烟酸 0.5 + 盐酸硫胺素 2.0 + 盐酸吡哆素 1.0 + 甘氨酸 2.0 + IBA 1.0 + 蔗糖 2.0% + 琼脂粉 0.7%，pH5.8。

增殖培养基设计了编号分别为 H－001、H－002、H－003、H－004、H－005 等 5 个不同处理，各处理的有机附加物、蔗糖、琼脂及 pH 条件与无菌发芽培养基基本相同或完全相同。其余条件分别为：H－001：SJ－1 + 水解酪蛋白 500 + NAA 0.5 + KT 1.0；H－002：MS + IBA 2.0；H－003：H + KT 2.0 + NAA 0.1 + 活性炭 0.15%；H－004：MS + IBA 0.5；H－005：MS + IBA 1.0。

设计了 5 组培养基（包括对照共 13 个处理）以试验 NAA、IBA、IAA 和 KT 等 4 种外源激素对茎段增殖培养的影响，每种外源激素的浓度分别高 0.5，1.0，2.0 和 4.0 mg/L 等 4 种浓度梯度，以无激素培养基为对照（CK）；各处理的基本培养基均为 MS，有机附加物、蔗糖、pH 等条件均与无菌发芽培养基相同。

体胚诱导及成苗培养基同 H－004；体胚苗壮苗培养基同 H－005。

2 结果与分析

2.1 种子的无菌发芽

黄秋葵种子在无菌发芽培养基上萌发较快。至接种后第 5 天，大部分种子已开始萌动；接种后第 10 天，约有 95%种子萌发，株高已达 2.0~2.5 cm；接种后 25 天时，株高一般在 5~6 cm。此时即可将无菌苗切割成带一叶一腋芽的茎段转接到增殖培养基上，或切取其节间茎段转接到诱导培养基上用于诱导愈伤组织形成。

2.2 不同增殖培养基的培养效果

供试的 5 种培养基均不能使离体茎段形成丛芽。其中，凡是含有细胞分裂素类激素的培养基（H－001 和 H－003）均会使所接种的茎段材料愈伤组织化（图版Ⅰ：2），不仅不能形成丛芽，甚至连腋芽也不能萌发。而单独使用生长素激素时则不会使茎段愈伤组织化。例如，单独加入 IBA（0.5 mg/L~2.0 mg/L）的培养基，可以使腋芽萌发，并同时产生良好根系，形成完整植株；其中以 MS + 1.0 mg/L IBA 的配方比较适合用于黄秋葵茎段离体快繁（微扦插），该培养基可以用于反复继代培养黄秋葵的组培苗茎段。带一叶一芽的茎段在该培养基上培养 30 d 左右时，可形成株高 6~7 cm 的完整植株。此时可以把每个植株切割成 3~4 段转接到新配制的同配方的新鲜培养基上再进行继代培养，即每次继代培养可以增殖 3~4 倍。

2.3 不同种类和不同浓度外源激素对茎段增殖培养的影响

不同种类和不同浓度的外源激素对黄秋葵茎段增殖培养的影响可归纳为以下几个方面：

2.3.1 在无激素的 MS 培养基上（CK），黄秋葵离体茎段的腋芽能较好地萌发，茎段基部可形成较好的根系（基内根），而且根较长；茎段基部切口很少或无愈伤组织产生。但在 MS 培养基中追加 1.0 mg/L

IBA，可以明显地促进根系的发育，腋芽萌发及生长状况良好，长势均匀。

2.3.2　KT 不仅不能促进腋芽的萌发或丛芽的形成，反而会非常强烈地抑制腋芽的萌发和生长，并能强烈地促进培养物脱分化形成愈伤组织。在 0.5 mg/L ~ 4.0 mg/L 范围内，这种抑制腋芽萌发和生长的作用以及脱分化的作用均随着外源 KT 的浓度递增而明显增强。

2.3.3　NAA、IBA 和 IAA 3 种生长素类的外源激素均有促进黄秋葵离体茎段腋芽萌发并形成良好根系的作用，其中以 IBA 效果最佳。三者的推荐使用浓度范围为 1.0 mg/L ~ 2.0 mg/L，其中 IBA 的最佳浓度为 1.0 mg/L。NAA 能比较强烈地诱导黄秋葵离体茎段形成发达的气生根，而 IBA 和 IAA 则主要是促进基内根的形成。

2.4　体胚发生、成苗及其在壮苗培养基上的生长情况

愈伤组织在含有 0.5 mg/L IBA 的 MS 培养基上（H－004）培养 50 ~ 60 d 时，用肉眼即可观察到约有 25%的愈伤组织块能形成密集的体细胞胚状体（图版Ⅰ：5）；至接种后 80 ~ 90 d 时，大多数的体细胞胚已发育成为密集在一堆的小苗（图版Ⅰ：4）。这些小苗基部仍接在一起，但用镊子轻轻挑拨，即可将其分开为一株株单独的小苗（图版Ⅰ：3，6）。

将成束的体胚小苗在无菌条件下，分割为单独的小植株，并转接到附加有 1.0 mg/L IBA 的 MS 培养上，经 25 ~ 30 d 左右的壮苗培养（图版Ⅰ：1），小苗株高可达 7 ~ 8 cm。此时即可出瓶炼苗移栽，或将其切割为 3 ~ 4 段，再进行继代增殖培养。

3　讨论

黄秋葵在生产上均是通过种子繁殖，目前尚未见到有关黄秋葵组培快繁的公开报道。我们的工作表明，黄秋葵的组织培养至少可以通过茎段培养（微扦插）和胚状体途径等两种不同方式实现植株再生和快速繁殖。目前茎段培养（微扦插）途径每继代培养一次可以增殖 3 ~ 4 倍，这种增殖速度已完全可以应用于黄秋葵种苗的组培工厂化生产。胚状体途径应更具理论价值和应用价值。我们目前的工作仅限于在固体培养基上有 25%左右的愈伤组织可以产生体细胞胚并再生形成完整小植株，同时已开始对黄秋葵体细胞进行液体悬浮培养和显微观察。从显微观察的结果来看，黄秋葵体细胞胚的形成过程与一般植物的合子胚形成过程极为相似。我们相信，这项工作的逐步深入将有助于黄秋葵人工种子的研制和胚胎学研究，同时也有助于黄秋葵基因工程的研究工作。有关黄秋葵体细胞悬浮培养、体胚形成与植株再生过程等内容将另文报道。

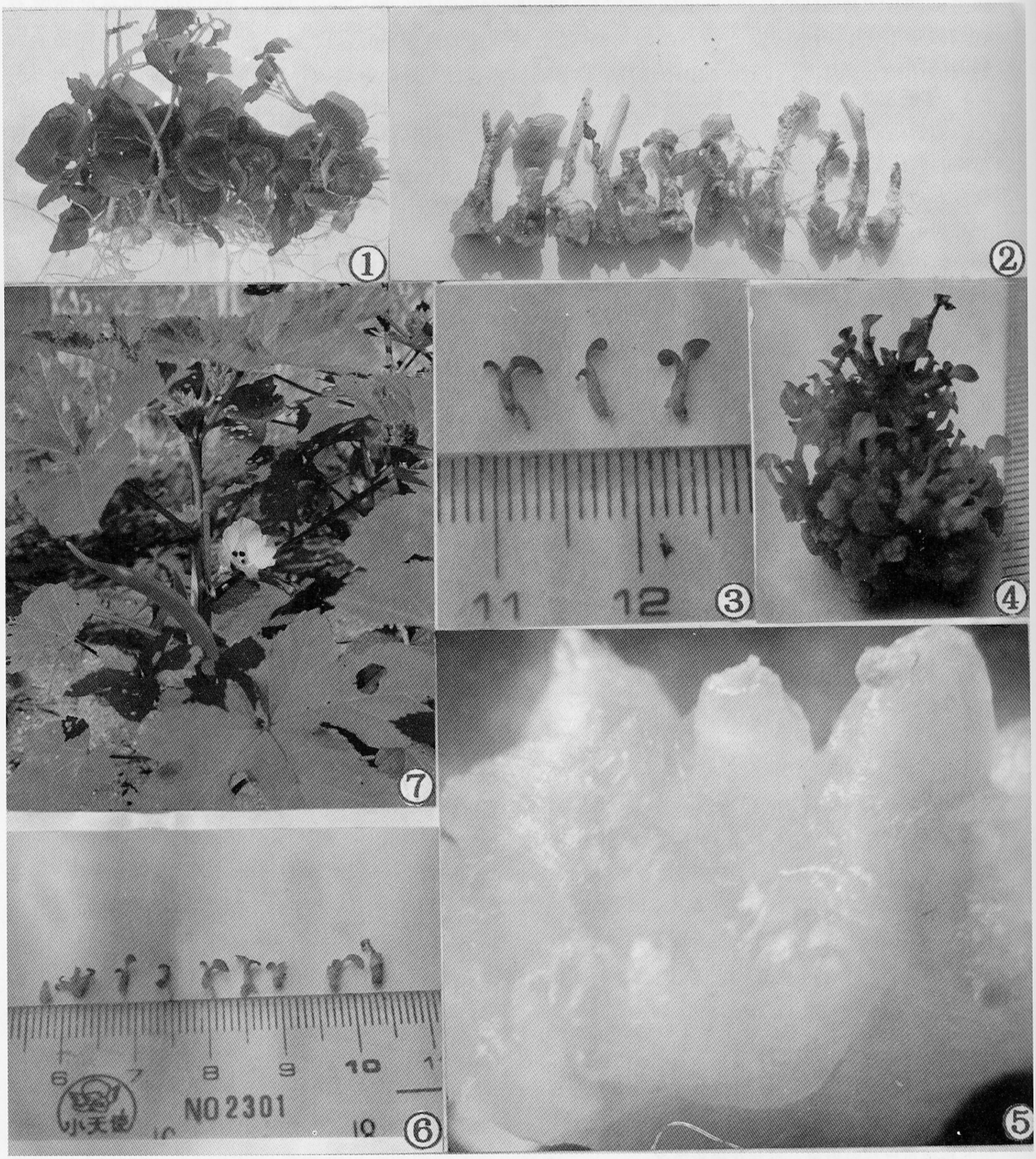
〔参　考　文　献〕

马传先．黄秋葵高产栽培技术［J］．北京农业，1999，(4)：16—17
李正应主编，稀有蔬菜栽培技术［M］．北京：科学技术文献出版社，1993
翁文．保健蔬菜——黄秋葵［J］．福建农业科技，1997，(2)：41—42
雪珍等．易栽培健胃蔬菜——黄秋葵［J］．浙江农业科技，1999．(1)：11
曹孜义，刘国民．实用植物组织培养技术教程（修订本）［M］．兰州：甘肃科学技术出版，1999

图版说明

图版Ⅰ　① 通过茎段离体快繁获得的黄秋葵完整组培小苗；② 在含有 2.0 mg/L KT 及 0.1 mg/L NAA 的 H 培养基上，茎段材料不仅不能形成丛生芽，反而被愈伤组织化。③ 由体细胞胚发育而成的体胚苗，形态上类似于无菌实生苗。④ 愈伤组织在附加 0.5 mg/L IBA 的 MS 培养基上培养 80 d 左右时，约有 25%的愈伤组织块能形成密集的体细胞胚，并发育成密集在一堆的丛生小苗。⑤ 密集的体细胞胚。⑥ 用镊子轻轻挑拨丛生的体胚苗，即可分开为单株体胚苗。⑦ 2000 年夏季的移植黄秋葵组培苗，示开花结果情况。

Explanation of Plates

Plate Ⅰ　① The complete plantlets of *Hibiscus esculentus* L. via stem segment culture in vitro. ② The stem segments，cultured on H

medium supplemented with 2.0 mg/L of KT and 0.1 mg/L of NAA, didn't clustered shoots, and the materials were dedifferentiated to form calli. ③ The plantlets desived from somatic embryoids, simillar to the sterile seedlings morphologically. ④ About 2.5% of calli, cultured on MS medium supplemented with 0.25 mg/L of IBA for 80 days, formed massed somatic embryoids, and then developed into mass culstered plantlets. ⑤ Mass somatic embryoids. ⑥ The clustered somatic-embryoid plantlets could, be easily separated into each other by tweezers. ⑦The plants with flowers and fruits, derived from sterile plantlets transplanted in the summer of 2000.